

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-512405

(43) 公表日 平成8年(1996)12月24日

(51) Int.Cl.⁶

G 0 1 N 33/497

A 6 1 B 5/08

識別記号

庁内整理番号

8310-2J

7638-2J

F I

G 0 1 N 33/497

A 6 1 B 5/08

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願平7-503995
(86) (22) 出願日 平成6年(1994)7月4日
(85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)1月5日
(86) 国際出願番号 P C T / S E 9 4 / 0 0 6 5 9
(87) 国際公開番号 W O 9 5 / 0 2 1 8 1
(87) 国際公開日 平成7年(1995)1月19日
(31) 優先権主張番号 9 3 0 2 3 2 4 - 0
(32) 優先日 1993年7月6日
(33) 優先権主張国 スウェーデン (S E)
(31) 優先権主張番号 9 4 0 1 3 2 4 - 0
(32) 優先日 1994年4月20日
(33) 優先権主張国 スウェーデン (S E)

(71) 出願人 アルビング, チェール
スウェーデン国エス-752 27ウプサラ、
ビンドヘムスガータン15アー番
(71) 出願人 ワイツベリ, エドワード
スウェーデン国エス-115 50ストックホルム、
スタレングスリッゲン36番
(71) 出願人 ルンドベリ, ヤーン
スウェーデン国エス-182 64ユースホルム、
ヘルゲベージェン10番
(72) 発明者 アルビング, チェール
スウェーデン国エス-752 27ウプサラ、
ビンドヘムスガータン15アー番
(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

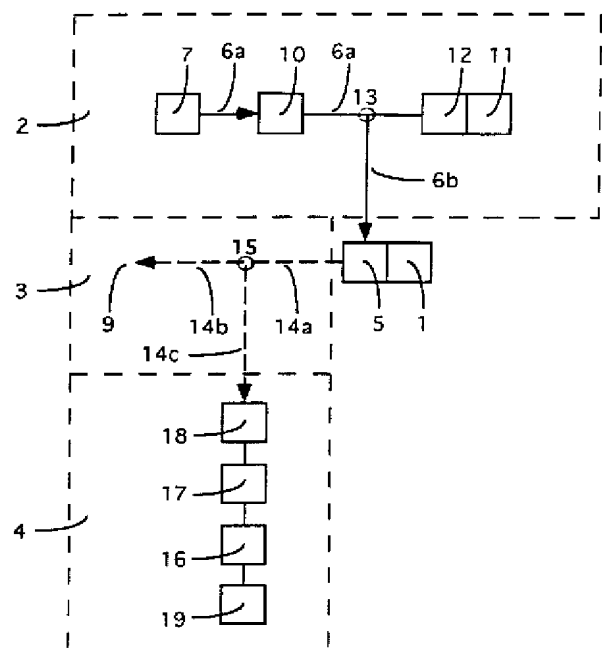
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 呼気中のNOレベルの測定に使用されるシステムおよび異常NOレベルに関連する疾患の診断方法

(57) 【要約】

呼気中のNOレベルを使用するシステム。該システムは、(i) マスク着用を意図する個人の鼻および/または口をぴったりと覆う顔面マスク (1)、(ii) 吸気用の流入ユニット (2)、(iii) 呼気用の流出ユニット (3)、(iv) それを通して吸気および呼気が各々通過する非一呼吸バルブ (5)、および (v) 該流出ユニット (3) に連結されたNO (4) のための測定ユニットよりなる。気道における炎症性疾患の哺乳動物における診断方法。特徴的要件は一酸化窒素NOを呼気中で測定し、見い出された異常レベルを気道における炎症性疾患の指標として採用することである。

Fig. 1a



【特許請求の範囲】

1. (i) マスク着用を意図する個人の鼻および／または口をぴったりと覆う顔面マスク(1)、

(ii) 吸気用の流入ユニット(2)、

(iii) 呼気用の流出ユニット(3)、

(iv) それを通して吸気および呼気が各々通過する非－再呼吸バルブ(5)、および

(v) 該流出ユニット(3)に連結されたNO(4)のための測定ユニット；よりなる呼気中のNOを測定するためのシステム。

2. 吸気用の流入ユニット(2)が雰囲気空気(9)に対する開口を有するチューブ(6a、6b)よりなり、該チューブには雰囲気空気(9)に存在するNOの除去のためのフィルター(8)が装備されている請求項1記載のシステム。

3. 吸気用の流入ユニット(2)が、好ましくは有意でないレベルのNOを含有する呼吸空気(7)を含む加圧容器に連結されたチューブよりなる請求項1記載のシステム。

4. 弾性容器(11)が加圧容器(7)と非－再呼吸バルブ(5)との間のチューブ(6a、6b)に連結された請求項3記載のシステム。

5. 流出ユニット(3)が、呼気の一部(試料空気流)を測定ユニット(4)へと転じるためのT－コネクション(15)よりなる呼気用のチューブ(14a、14b、14c)を有する請求項3または4記載のシステム。

6. 試料空気流(15)が、当該システムが雰囲気空気による汚染が回避されるように適用されることが意図される個人の平均呼吸流速度(分容量)未満である請求項3～5いずれか1項に記載のシステム。

7. (i) 呼気の乾燥のためのフィルター(16)、

(ii) 呼気中のCO₂の除去のためのフィルター(17)、および

(iii) 粒子フィルター(18)；

から選択される少なくとも1つのフィルターが、検出器を標的とする空気がまず

該少なくとも1つのフィルターを通過するようなフィルター(16、17、18

）を設けて、流出ユニット（3）におけるチューブ（14 a）または（14 c）に連結されているか、あるいは測定ユニット（4）と一体化されている請求項3～6 いずれか1項に記載のシステム。

8.（i）フローメーター（10）、および

（ii）（a）吸気用のチューブ（6 a、6 b）における圧力の形成、および

（b）流入ユニット（2）から非－再呼吸バルブ（5）を介しての流出ユニット（3）への空気の漏出を防ぐための流出バルブ（12）；

から選択される少なくとも1の器具を有する請求項3～7 いずれか1項に記載のシステム。

9.（i）内因的に発生したNOのレベルを呼気中で測定し、（ii）見いだされた異常なレベルを気道における炎症性疾患またはその危険性の指標として採用することを特徴とする気道における炎症性疾患を哺乳動物において診断する方法。

10. NOのレベルを経口もしくは経鼻呼気で測定し、正常集団と比較して上昇したレベルを、気道における炎症性疾患、例えば、喘息または鼻炎の指標として採用する請求項9記載の方法。

11. NOのレベルを経鼻呼気中で測定し、正常集団と比較して低下したレベルを、上部気道における急性炎症の指標として採用する請求項9記載の方法。

【発明の詳細な説明】

呼気中のNOレベルの測定に使用されるシステムおよび異常NOレベルに関連する疾患の診断方法

技術分野

発明の名称参照。本発明は、ヒトを含めた哺乳動物では、（ヒトを含めた）哺乳動物の呼気中の一酸化窒素（NO）のレベルは、ある種の疾患（病気）をそれを獲得する危険も含めて示す。今日、この考えは、少なくとも、アレルギー性喘息および鼻炎、ヒトにおける気道感染、ならびにカルタゲネル症候群のごとき気道の炎症性疾患の診断で有用であることが示されている。特に、下部気道における感染が診断できる。

使用される測定原理は、正常なヒト気道におけるNO生産は上部気道、特に鼻洞に限られることを示してきた。また、NOは胃で生産されることも示されている。

気道とは、鼻孔から呼吸器の細気管支までの導入気道を意味し、粘膜組織および鼻洞含む。

背景

ここ数十年にわたって、一酸化窒素（NO）の生物学的役割に対するいくつかのアプローチがなされてきた。今日、L-アルギニンを基質として用いる特別のNOシンターゼによって触媒されるNOの合成は、多くの細胞のタイプで起こることが示されている（Nathan C., FASEB J. 6（1992）、3051-64）。該NOシンターゼは、2つの主要なクラス：構成的および誘導的なものに分けることができるいくつかのイソタイプで存在する。構成的イソタイプは内皮細胞に（Moncada D. et al., Pharmacol. Rev. 43（1991）109-42）、例えば、副交感血管拡張神経（Kummer W. et al., Neuroreport 3（1992）653-55）にあると記載されてきた。誘導的イソタイプは、活性化の後、マクロファージ、好中球、内皮細胞、血管平滑筋（Moncada S. et al., Pharmacol. Rev. 43（1991）109-42）および喘息患者の気道における上皮細胞（Springall et al., Am. Rev. Resp. Dis. 147（1993）

A515)で見い出される。NOの生産は血漿および尿中の最終生成物亜硝酸塩および硝酸塩の増加がいくつかの場合に用いることができるが、in vivoで直接的に測定するのはこれまで困難であった(Archer S., FASEB J. 7(1992) 349-360)。しかしながら、最近、実験動物およびヒトの呼気において、ピーピーピー(p.p.b.)レベルで見い出すことができる(Gustafsson L.E. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun, 181(1992) 852-7)。Gustafssonらは、化学ルミネッセンス検出器を呼気に接触させるか、あるいは呼気をNOが化学的にトラップされる溶液に通気することによってNOレベルを測定した。ヒトでの実験は、鼻を通して吸気し、口を通して呼気する1人の個人で行われたようである。本発明者らのものと比較してGustafssonらが得た比較的高いNOレベルは、吸気が鼻を通る時にNOがそれに移動することによって説明できよう。後の発表において、Persson M.G.およびGustafsson L.E.は、ウサギの呼気で測定して、エタノール摂取がNOの形成を低下させるであろうことを報告している(Eur. J. Pharmacol. 224(1992) 99-100)。Gustafsson L.E.自身は、呼気中の測定されたNOレベルを用いて肺機能をチェックできることを示している(WO-A-9305709およびSE-91032433)。Gustafsson L.E.の成果は最も近い先行技術のようである。

優先期間の年の間、喘息患者の呼気におけるNOレベルの増大および喫煙者におけるレベルの低下が公表されている(Alving K. et al., Eur. Resp. J. 6(1993年10月) 1368-70; Hamid Q. et al., Lancet 342(1993年12月) 1510-13; Karithonov S. A. et al., Lancet 343(1994年1月) 133-35; および Persson M.G, et al., Lancet 343(1994年1月) 146-7)。

発明の目的

本発明の第1の主要な目的は、内因的に生産された一酸化窒素(NO)が呼気で検出できるという以前の発見の利用を提供することにある。

第2の目的は、呼気におけるNOレベルの測定のための改良されたシステムを提供することにある。

第3の目的は、呼気における異常NOレベルに関連する疾患(病気)についての改良されたより信頼できる診断方法を提供することにある。優先日において、

本発明者らは、注目する病気が、気道における炎症疾患（炎症を発病する危険も含む）、例えば、アレルギー性喘息および鼻炎、特に下部気道における感染に関連していたという結果を有していた。優先期間の年の間、本発明者らは、鼻に由来するNOは鼻洞が起源であり、鼻から吐き出された空気におけるゼロに近いレベルはカルタゲネル症候群の価値ある指標であり、恐らくは、副鼻腔炎の進展についての増大した罹患性であることを認識した。また、本発明者らは、逆流空気は（胃で形成された）高レベルのNOを含有し、逆流空気中の異常NOレベルは胃の障害と関連するようであることを示した。例えば、本発明者らは、胃のHCl生産の阻害または低下の結果、NOレベルが低下し、かくして、逆流空気中のNOレベルを用いて、胃酸の分泌を阻害する薬物での処理をモニターすることができる。また、呼気（好ましくは、経口呼気）中のNOレベルの増大は、胃食道（胃からのNOを含めた胃の内容物の異常漏出）の指標となり得る。本発明の方法は予後的価値も有するようである。

図面の説明

図1 aおよび1 bは、経鼻呼気および／経口呼気中のNOを測定するのに有用なサンプリングおよび測定システムを示す。図1 aにおいて、該システムは実質的にNOを含まない空気を呼吸するための加圧源を利用し、図1 bにおいて、該源は雰囲気空気である。図面中で対応する機能は同一の数字によって表される。

図2は、経口呼吸（点線）、経鼻呼吸（実線）または気流での経鼻通気（破線）の最初の5分間における、対照被験者の呼気における化学ルミネッセンス技術によって検出されたNO（p.p.b.）のレベルを示す。矢印は、口を閉じて、息を殺した期間を示す。データは平均値±SEMとして表す。

図3 aおよび3 bは、経口呼吸（図3 a）、および経鼻呼吸（図3 b）の最初の5分間における対照（点線）および喘息患者（実線）の呼気におけるNOの検出されたレベル（p.p.b.）を示す。データは、平均値±SEMで示す。対照と比較して、**P<0.01、***P<0.001（Mann-Whitney U-検定）。

発明

NOを測定するためのシステム

呼気中のNOを測定するための本発明のシステムは図1に示され、患者の口および／または鼻を被覆する顔面マスク(2)、吸気用の流入ユニット(2)、呼気用の流出ユニット(3)、およびNO測定ユニット(4)よりなる。該流入および流出ユニットは、好ましくは該顔面マスクに位置させた非-再呼吸バルブ(5)を介して相互に連結させることができる。示されるごとく、「顔面マスク」なる語は、それを通して呼吸できるマウスピースまたはノーズピースよりなる。マウスピースは、好ましくは、鼻クリップと組み合わせて用いられる。通常の顔面マスクおよび非-再呼吸バルブを用いることができる。用いる顔面マスクが口および鼻の双方を被覆する場合は、透明マスクが有利である。

流入ユニット(2)には2つの主な代替品がある。第1の代替品(図1a)は、好ましくは、正常に呼気された空気で見い出されたレベル未満の(例えば、1 p.p.b.未満の)NOを含有する、呼吸空気の加圧源(7)に該マスク(1)を連結するチューブ(6a、6b)よりなる。第2の代替品(図1b)は、好ましくはNOを除去するためのフィルター(8)を介する、雰囲気空気(9)に該マスク(1)を連結するチューブ(6a、6b)よりなる。

加圧源(7)からの空気のバランスしスムーズな供給で該マスク(1)を支持するために、少なくとも1つのフローメーター(10)と流出バルブ(12)に連結した弾性空気容器(11)とを、マスク(1)および加圧空気源(7)の間のチューブ(6a、6b)に、下流に向かう順で連結しなければならない。該フローメーター(10)はテスト被験者の空気の消費に適合させ空気流を調整するために使用する。空気流出バルブ(12)、例えば、ベルナー(Berner)バルブは、該弾性容器(11)中に圧力が形成されるのを回避するために用いられるが、該弾性容器(11)を呼吸の間に適当に膨張させる。空気流出バルブ(12)は、空気を非-再呼吸バルブ(5)に通さない低圧で開くように設定すべきである。好ましくは、該弾性容器(11)は、T-コネクション(13)を介してチューブに連結した共通の流入／流出口を有する。

呼気用の流出システム(3)は、チューブ(14a、14b、14c)、ならびに流出流を2つのライン(14b、14c)に分けるT-コネクション(15)

よりなる。1のライン(14c)は呼気の一部を測定ユニット(4)に導く。他のライン(14b)は、過剰の空気を管理し、それを雰囲気空気(9)まで導く。測定ユニットへの示された流動は異なる方法にてセットすることができる。ほとんどの商業的に入手可能なNO検出器は、該検出器を通過する流動を制御するための流動レギュレーター中にビルト(built)を有する。他の代替品において、流出チューブ(14a、14b、14c)は、呼気流を測定ユニット(検出器)へ供給するのを確保するのが重要であるにも拘わらず、測定ユニット(4)に行く部分的流動を調節するための1以上のバルブを有することができる。適当な長さのチューブ(14b)を介して過剰の空気を雰囲気空気に導いて、雰囲気空気からの逆流および汚染を回避することができる。さらに、雰囲気空気からの汚染が測定ユニット(検出器)に侵入しないことを確保するために、測定ユニットに向かう呼気流の一部は、平均呼吸流速度より小さい、例えば、平均呼吸流速度の5%超、好ましくは50%未満とすべきである。測定ユニット(4、図1bに示す)まで行く、または測定ユニット(4、図1aに示す)と一体化された外方チューブ(14a、14c)には、NOの測定に干渉し得る呼気に存在する物質の除去のための1以上のフィルター(16、17、18)があり得る。後記参照。

測定ユニットは、空気中のNOを測定するための満足すべき感度(1p.p.b.およびそれ以上)を与えるいずれかの方法よりなるものとできる。通常に認められている技術は化学ルミネッセンスに基づき、発光反応:



を利用する。形成されるNO₂の約20%が励起状態(NO₂^{*})で得られる。NO₂^{*}からNO₂への遷移の間に発光が起き(化学ルミネッセンス)、これは、NO濃度に比例する。O₃は過剰に供給する。Fontijn et al., Anal. Chem. 42(1970) 575-79参照。発光反応(NO₂^{*}からNO₂)からのシグナルは、水および二酸化炭素のごとき物質によって低下させることができる。これは、絶対値を得るためには、これらの物質を測定前に試料から除去しなければならないことを意味する。これは、測定操作(水用のフィルターである16およびCO₂用のフィルターである17)に干渉する物質を除去するために、試料をフィルターに通す

ことによって達成できる。第2のタイプの妨害物質は、フィルター（粒子フィルターである18）によって除去できる粒子である。二酸化炭素および水の含量は呼気ではかなり一定であるので、本発明のシステムで最も重要な粒子フィルター（18）を残して対応するフィルターを省略することができる。NOを測定するために適する検出器／器具（19）は市場で入手できる。前記参照。

当該システムは長時間にわたる連続的測定（何回かの呼吸の混合空気）または個々の呼吸の呼気中のNOの測定（単一の呼吸分析）で用いることができる。また、当該システムは、胃から空気を戻した後におけるピークNOレベルの測定を可能とする。本発明のシステムの使用は、実験パートに記載する。後記参照。

実験パートで用いたシステムは、優先日の時点で最も好ましいものと考えられた。優先期間の年の間、経口呼気をサンプリングする場合には、口マスク（マウスピース）が患者により便利であることが認識された。

診断方法

本発明の方法は、気道において炎症疾患（従って、危険性も含む）に悩む哺乳動物、好ましくはヒト個人を発見する診断方法である。該方法は、哺乳動物からの呼気において、内因的に発生したNOを測定し、見い出された異常レベルは哺乳動物の気道における炎症疾患の指標となる点に特徴がある。

鼻から吐き出された空気については、低下したNOレベルがひどい鼻浮腫および分泌を引き起こす急性炎症反応に関連することが見い出され、一方、上昇したNOレベルは、雰囲気中の炎症薬剤の低暴露および／または鼻炎症の危険性に関連することが見い出された。かくして、経鼻呼吸の間のNOの上昇したレベルは、鼻粘膜における潜在性および臨床両炎症疾患に関係し得る。経口呼気については、低い範囲の上昇したNOレベルは、下部気道における潜在性疾患の指標となり、かくして、臨床炎症疾患の発生についての予後徴候となり、一方、高い範囲は下部気道における急性および慢性炎症性疾患双方の指標となる。経鼻呼気および経口呼気におけるNOレベルを比較して、各々、下部気道および上部気道からの相対的寄与を決定すべきである。

「下部気道」および「上部気道」なる語は、各々、声門の下方および上方を意

味する。

経口呼吸中のNOを測定する場合、患者は口を通して呼吸するのが好ましい。
経鼻呼吸については、患者は鼻を通じて吸気するのが同様に好ましい。

材料および方法

実験の主題：NOレベルをヒト被験者の呼吸で測定した。対照被験者は非喫煙者であって健康な個人（27～52歳）であり、喘息患者は、少なくともラット・アレルギーに対するアレルギーおよび軽い喘息および鼻炎の専らの症状が確認された、非喫煙者であってアトピーの個人（33～45歳）であった。喘息患者は2つのケースを除き非症状期間にテストした（後記参照）。喘息患者のうち2人にはグルココルチコイド（ブデソニド（budesonide））を規則的に吸入させ、2人には兆候がある場合には β_2 -アゴニストまたはクロモグリケート（cromoglycate）を吸入させ、4人にはいずれの薬剤も摂取させなかった。かば花粉に対してアレルギー性鼻炎を持つが喘息を持たない被験者の群（ $n=9$ ）は、花粉の季節をはずし、アレルギーでの鼻刺激の前後における経鼻呼吸の間にテストした。アレルギー性鼻炎（かば花粉）を持つが喘息を持たない2人の他の被験者において、花粉の季節を外して経口呼吸をテストとした。アレルギー性鼻炎（かば花粉）を持つが喘息を持たないもう1人の被験者において、かば花粉季節の直後に経口および経鼻呼吸をテストした。対照被験者における下部気道ウイルス感染の3つのケースを除き、すべての被験者は、呼吸器感染の自覚がない時にテストした。呼吸NOは、喘息のない、挿管した機械的に通気する患者において、集中看護室で測定した。実験は地方倫理委員会によって認可された。

方法

システムは図1に示すごとくに構成し、ガスチューブからのNOフリー（ <1 p.p.b.）空気を吸入し、呼吸中のNOを同時にかつ連続的に測定した。呼吸中の水および二酸化炭素の含有量は一定であるとみなされるので、水および二酸化炭素のフィルターは含めなかった。バーナーバルブを空気流出バルブ（12）として用いた。

使用する場合、顔面マスク流出口およびバーナーバルブ中の流出口を閉じるこ

とによって、および空気の流動を2リットル／分に設定することによって、システムをNOフリー空気（好ましくは、 $< 1 \text{ p.p.b. NO}$ ）で濯いだ。化学ルミネッセンスNO読みが 1 p.p.b. まで下降すると、顔面マスク中の流出口の栓を外し、顔面マスクをテストの被験者の鼻および口上に素早く備え付けた。次いで、バーナーバルブの流出口を $2 \text{ cm H}_2\text{O}$ に設定し、空気流を調整して最大容量（成人につき6～8リットル／分）の約3／4まで弾性容器を膨張させた。テストする個人を、口を閉じて鼻を通して、あるいは鼻クリップを用いて口を通して、顔面マスク中で自由に呼吸させた。呼気中のNOのプラトーレベルが認められるまで（このシステムでは < 5 分）、呼吸を継続させた。

鼻気道からの寄与を評価するために、口を通じて呼吸させるか、あるいは息を殺し、対照個人の1の鼻孔を通じてNOフリー気流（2～5リットル／分）を導入し、流出空気を対側からサンプリングした。流入口および流出口を口の異なる隅に入れ、息を殺しつつ、同様の測定を口腔中にて行った。テフロンチューブを介してNO／NO_x化学ルミネッセンス分析機（Eco Physics., Basel, スイス; Fontijn et al., Anal., Chem. 42 (1970) 575-79参照）に0.7リットル／分で継続的にサンプリングすることによって、流出側のNOおよび二酸化窒素（NO₂）のレベルを測定した。モリブデン熱変換器（Eco Physics）を用い、NO₂からNOに変換した後にNO_xを測定し、式： $[\text{NO}_2] = [\text{NO}_x] - [\text{NO}]$ によってNO₂濃度を計算した。

結果

健康な対照被験者を口および鼻を通じて呼吸させると、経口呼吸（ $9 \pm 1 \text{ p.p.b.}$ ）と比較して、鼻呼吸の間に（ $23 \pm 2 \text{ p.p.b.}$ ）かなり高いNOレベルが認められた（図2）。このシステムにおいて、NOのプラトーレベルには4分以内に到達し、合計10分以内にさらなる変化は認められなかった。空気流2リットル／分での鼻気道の通風の結果、流出口側でNOのレベルが非常に高くなった（図2）。もし被験者が口を閉じて息を殺し、かくして、1の鼻腔からのすべての空気を鼻咽頭を介して他の鼻腔に送るならば、これらのレベルはさらに上昇した。対照的に、口腔における同様の実験の結果、NOの低いプラトーレベルとなった。

($</ = 4$ p.p.b., $n = 5$)。また、NOの非常に低いプラトーレベルが、挿管し機械的に通気した患者の流出口側で認められた($n = 5$)。これらを考慮すると、これは、正常被験者における呼気中のNOは主として鼻粘膜で生成することを示す。いく人かの個人において、低レベルのNO₂($</ = 5$ p.p.b.)が測定期間中の最初に呼気で観察された。しかしながら、NO₂-フリー空気の呼吸の間に、呼気NO₂濃度は低下して5分以内に基礎レベルに到達した($</ = 2$ p.p.b.)。

軽い喘息および鼻炎を持つ無症状アトピー被験者の群において、経口呼吸間の呼気中のNOのレベルは対照被験者と比較して2～3倍高かった(図3a)。プラトーレベルを比較すると、対照(範囲5～16 p.p.b., $n = 12$)および喘息患者(範囲21～31 p.p.b., $n = 8$)間で重複がなかった。気管支閉塞の症状を引き起こすアレルゲンへの専らの暴露の後、呼気NO(6～8 p.p.b.)においてさらなる上昇が、定期的にグルココルチコイドを摂取していない2人の喘息患者で認められた。さらに、咳および気管気管支の痛みを引き起こす、対照被験者における下部気道感染のエピソードの間に、経口呼吸の間の呼気中のNOレベルの上昇が認められた(症状期間前 11 ± 2 p.p.b., 症状期間中 32 ± 4 p.p.b., 症状期間後 16 ± 1 p.p.b., $n = 3$)。他方、経鼻呼吸の間、上昇傾向は認められたにも拘わらず、呼気中のNOレベルの有意な上昇は、喘息患者において(図3b)および下部気道感染の間に(示さず)認められなかった。アレルギー性鼻炎を持つ患者において($n = 9$)、経鼻呼吸の間の呼気中のNOの基礎プラトーレベルは、季節外れにテストした場合、対照被験者におけるレベルに近かった(21 ± 2 p.p.b.)。しかしながら、アレルゲンで鼻を刺激した2分後、NOのプラトーレベルはわずかに低下して 17 ± 2 p.p.b.となった。この低下は15分間持続したが、24時間後、これらの被験者における経鼻呼吸の間の呼気中のNOレベルはベースラインに復帰した。アレルギー性鼻炎(かば花粉)を持つ2人の他の被験者において、経口呼吸をテストした。非アレルギー性対照と比較したNOの上昇したプラトーレベル(各々、21および23 p.p.b.)がこれらの被験者で認められた。アレルギー性鼻炎(かば花粉)を持つもう1人の被験者において、

かば花粉の季節の直後に、経口および経鼻呼吸をテストした。この被験者において、対照（範囲16～29 p.p.b.）と比較した経鼻呼吸（40 p.p.b.）の間のNOの上昇したプラトーレベルが認められた。しかしながら、経口呼吸の間、この被験者は低いプラトーレベル（11 p.p.b.）を有していた。

考察

呼気中で検出されたごとく、ヒト気道におけるNOの基礎産生は、鼻粘膜に限定されるようである。NOの正確な源は明らかとなっていないが、内皮細胞（Moncada S. et al., Pharmacol. Rev. 43 (1991) 109-142）または副交感神経（Kummer W. et al., Neuroreport 3 (1992) 635-655）であろう。これは、下部気道で産生されるNOの見掛け上かなり低い基礎レベルに適合する。というのは、血管新生および副交感神経支配は共に、鼻粘膜と比較して気管気管支粘膜では低いからである（Lundberg J.M. et al., In Bjorklund et al.編、Handbook of Chemical Neuroanatomy, vol 6: The peripheral Nervous system, Amsterdam, Elsevier, 1988 391-444）。挿管被験者で検出されたものと比較して、経口呼吸の間に認められたNOの高いレベルは、鼻咽頭粘膜に由来するNOを表すであろう。呼気中のNO₂の一時的存在は、NO₂-フリー空気の呼吸開始前に、雰囲気空気（5～20 p.p.b.の間のNO₂濃度）から吸収したNO₂のクリアランスとして解釈される。アレルギー性喘息および鼻炎を共に有する被験者における経鼻呼吸の間の呼気NOレベルは有意には増加しなかったという発見は、鼻気道の管腔構造における誘導可能なNOシンターゼの低レベルを反映するであろう。別の説明は、炎症した鼻粘膜におけるNOについての浸透性は分泌、浮腫および／または充血により低下し、その結果、内皮細胞および副交感神経のごとき深構造から内腔へのNOの移動が減少するというものである。これは、恐らくは、呼気で測定した場合、鼻粘膜の内腔構造におけるNO生産の増加をマスクするであろう。この考えは、アレルゲンの鼻粘膜への急性暴露の結果、経鼻呼吸間の呼気NOのレベルが低下し、一方、気管支粘膜の急性暴露の結果、経口呼吸の間のNOレベルが上昇するという事実によって支持される。しかしながら、経鼻呼吸の間の呼気中のNOレベルが花粉の季節の後に増大したという知見は、アレルゲン

の長期の低用量暴露の後には、内腔構造においてNOシンターゼが誘導されることを示す。アレルギー性鼻炎を持つが喘息を持たない被験者における経口呼吸の結果、3人の被験者のうち2人においてNOレベルが上昇した。レベルが上昇した2人の被験者はアレルギーの暴露の間に喉頭症状に患い、一方、レベルが上昇しなかった被験者はそうではなかった。これは、経口呼吸の間における呼気中のNOのレベルの上昇は喘息の将来の発生を予測できるであろうことを示す。

優先年の間における実験パートの追加

第1のシリーズの実験は、胃で生産された一酸化窒素（NO）が呼気で見いだされたレベルに寄与するか否かをチェックするために行った。

材料および方法

被験者： 実験した被験者は4人の健康な非喫煙者の個人（29～40歳）、および4人の非喫煙者のアトピー個人（30～40歳）であり、少なくともラット・アレルギーおよび穏やかな喘息および鼻炎の専らの症状に向けられたアレルギーが確認されている者であった。症状を有する場合には、喘息患者のうちの1人はグルココルチコイド（ブデソニド）を定期的に吸入しており、他の3人はベーター2アゴニストまたはナトリウムクロモグリケートを吸入していた。すべての被験者は、気道感染の自覚がない時にテストした。

胃から戻した空気におけるNOレベル： 空気の任意の逆流は、30℃の炭酸水、pH 5.5（Ramloesa[®], Pripps AB, スウェーデン）の摂取3～5分後に行った。逆流空気はテフロンチューブ系に導き、そこから、空気をNO化学ルミネッセンス分析器（CLD 700; Eco Physics, スイス）へと継続的にサンプリングし、NOのピークレベルを正常呼吸の間に登録した。胃から逆流した空気中のNOの測定は以下の前処理：

1. NO前処理（対照）
2. 氷山レタス50gの摂取（硝酸塩負荷）
3. 実験に先立ち24時間にわたって分布させた合計240mgのプロトンポンプ阻害剤オメプラゾール（Astra-Hassle AB, Gothenburg, スウェーデン）での経口前処理、

4. オメプラゾール前処理後におけるレタス50gの摂取；

のうちの1つと組み合わせて、絶食の10時間後に行った。

呼気のNOレベル： 被験者は、鼻クリップを装着させ、非一呼吸バルブに連結したマウスピースを介して、通常の1回呼吸容量にて、NOフリー空気（ $\text{NO} < 2 \text{ p.p.b.}$ ）を呼吸させた。呼気をテフロンチューブ系に導き、そこから空気を継続的にサンプリングし（0.8リットル／分）、NOの定常状態レベルを記録した。オメプラゾール前処理の有無を問わず、絶食の10時間後には測定は行わなかった。また、健康な被験者および公知の胃食道反射を持ち医薬投与を止めた患者に、鼻クリップを装着させつつ、顔面マスク中で呼吸させ、両者は直立に座らせおよび仰臥位置とした。嚥下を記録した。

結果： 逆流空気中の絶食10時間後の対照NOレベルは $602 \pm 102 \text{ p.p.}$ であり、これらのレベルはレタスの摂取後に4倍上昇した。オメプラゾールでの前処理は、レタスの摂取の有りの場合および無しの場合の双方において逆流空気におけるNOレベルを低下させた（各々、95%および75%）。絶食の10時間後、正常な排気量での呼吸の間における呼気中のNOの定常レベルは、健康な被験者および喘息患者において各々、 $4 \pm 1 \text{ p.p.b.}$ （ $n = 4$ ）および $14 \pm 1 \text{ p.p.b.}$ （ $n = 4$ ）であった（ $P < 0.05$ ）。オメプラゾール前処理はいずれの群におけるこれらのレベルも有意には変化させなかった。in vitro実験は、0.9ないし2.5のpH範囲内では、酸度を咀嚼したレタスならびに唾液単独において増大させた場合に、NOの形成は増加したことを示した。

胃食道反射を持つ健康な被験者および患者双方において、仰臥位での経口呼吸の間に、NOレベルの偶然で迅速なピーク（基礎レベルと比較して3～4倍増加）が認められた。NOピークは常に対照被験者における嚥下に関係しており、一方、嚥下に関係ないいくつかのNOピークが反射患者で認められた。

検討： 本実験において、本発明者らは、NOの主要源として胃を突き止めた。胃内NOは主として非酵素的に形成され、酸性環境を必要とするようである。というのは、オメプラゾールによる胃酸の分泌の阻害は逆流空気中のNOをほとんど無くしたからである。これは、逆流空気中のNOのレベルは胃液のpHを反映

することを示す。逆流空気中のNOのレベルは、口を通じての正常な排気量の呼吸の間における呼気中のレベルと比べて、絶食条件の間では約100倍高く、硝酸塩摂取後には400倍高いことが判明した。しかしながら、胃における高NOレベルは、健康な被験者または喘息患者における正常な呼吸の間において呼気中のNOレベルに継続的には寄与しないようである。というのは、経口呼気中のNOレベルはオメプラゾール前処理によって影響されなかったからである。これらの知見は、患者において胃食道反射の診断で使用する可能性を示し、嚥下無関係NOピークは胃食道反射の指標となり、測定は好ましくは水平位の患者にて経口呼気について行う。さらに、逆流空気におけるNOレベルは胃酸分泌を阻害する薬物での治療をモニターするのに使用することができる。

鼻由来NO

第2のシリーズの実験は、鼻由来のNOの正確な起源および有意性を判断するために行った。

材料および方法： 3人の健康なボランティアにおいて、鼻腔から、あるいは鼻壁を通っての貫通（自動注射針）を介して1の上顎洞からシリンジに直接空気をサンプリングした。空気の試料はNO分析器に直接注入し、ピークレベルを登録した。鼻腔および上顎洞からの粘膜バイオプシーは手術を受けている患者で採り、異なるNOシンターゼの存在を、特異的モノクローナル抗体を用いる免疫組織化学的技術によって調べた。また、呼気NOレベルをカルタゲネル症候群を持つ患者で測定した（n = 4）。

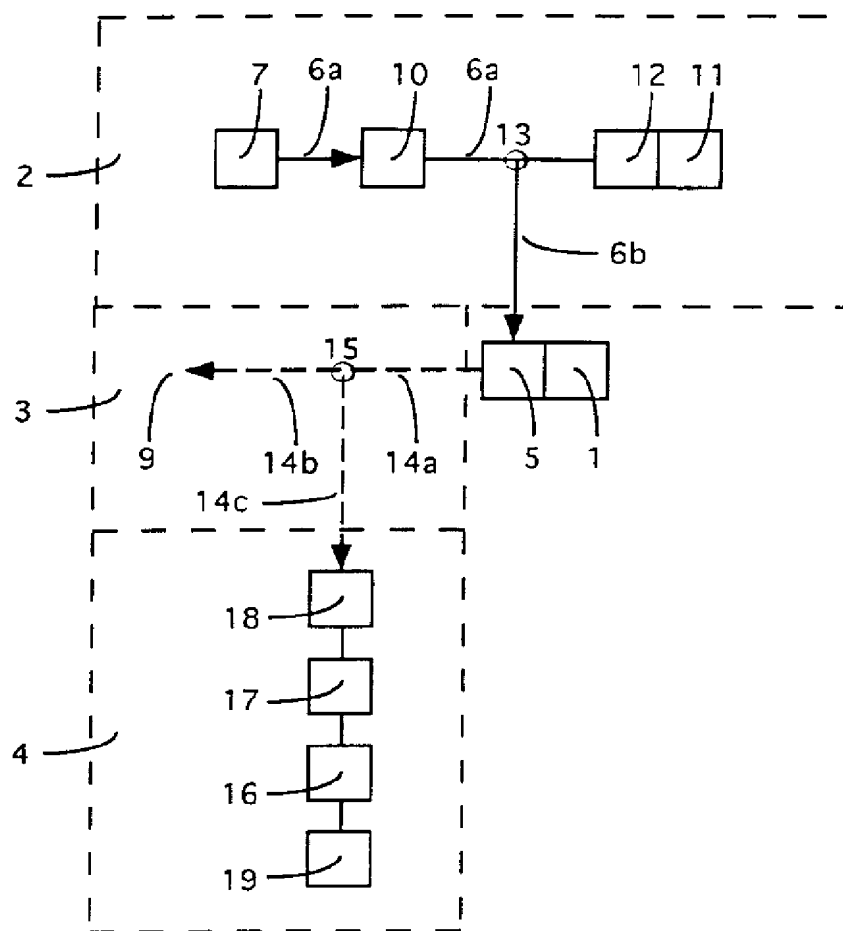
結果： 鼻腔からの空気（200～300 p.p.b.）と比べて、かなり高いNOレベルが上顎洞から収集した空気（3000～4000 p.p.b.）で観察された。それに合致して、NOシンターゼの誘導可能形態の高発現が、上顎洞からの上皮細胞における免疫組織化学によって検出されたが、鼻腔からのものでは検出されなかった。カルタゲネル症候群を持つ患者では、ゼロに近い呼気NOレベルが経口および経鼻呼吸双方の間に見い出された。

検討： 誘導可能なNOシンターゼはヒト鼻洞の上皮細胞で構成的に発現され、見たところ非常に活性のようである。鼻洞におけるNOの高い内腔濃度は、一次

的で非特異的な宿主の防御の重要な成分である。というのは、高濃度のNOは抗菌作用があることが示されており（Moncada S. et al., Pharmacol. Rev. 43 (1991) 109-42）、また、鼻洞は鼻腔とは対照的に通常は滅菌されているからである。かくして、NOの低鼻濃度はカルタゲネル症候群様の気道上皮病および副鼻腔炎の増大した罹患性の指標となり得る。

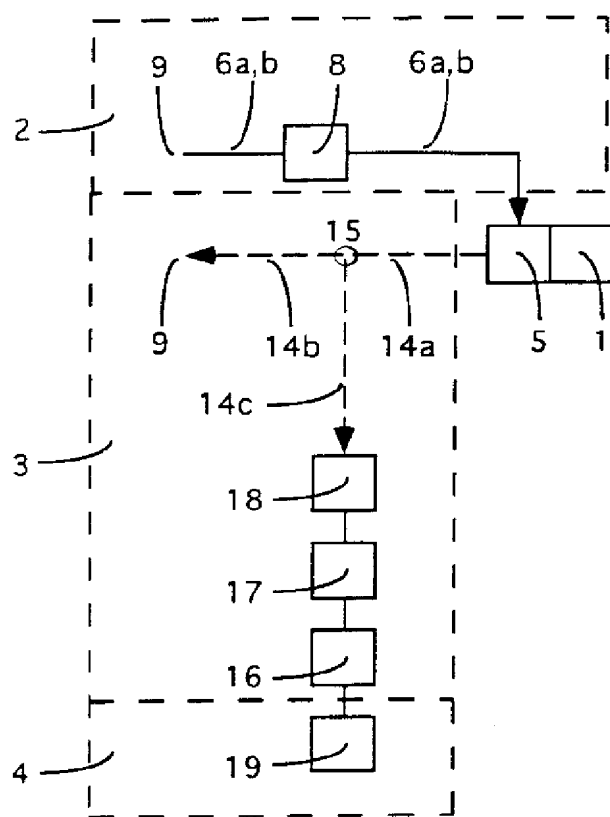
【図1a】

Fig. 1a



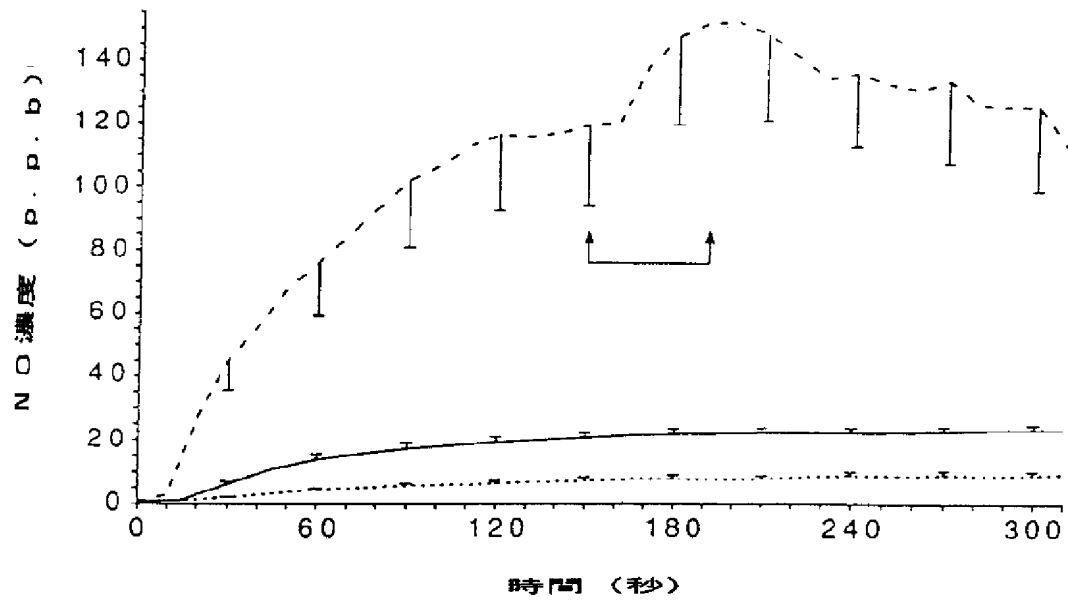
【図1】

Fig. 1b



【図2】

Fig. 2



【図3】

Fig. 3a

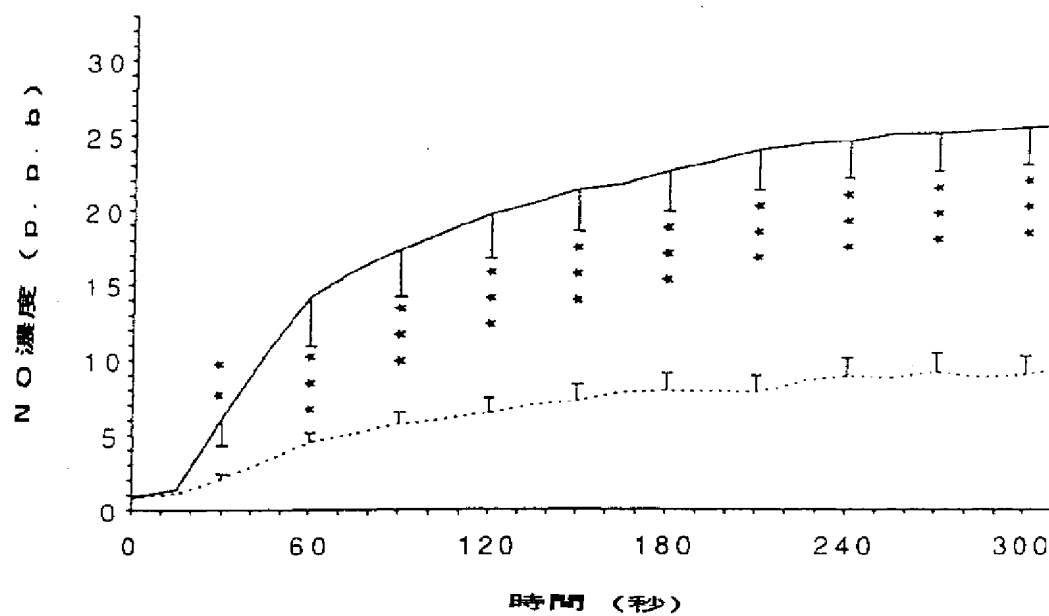
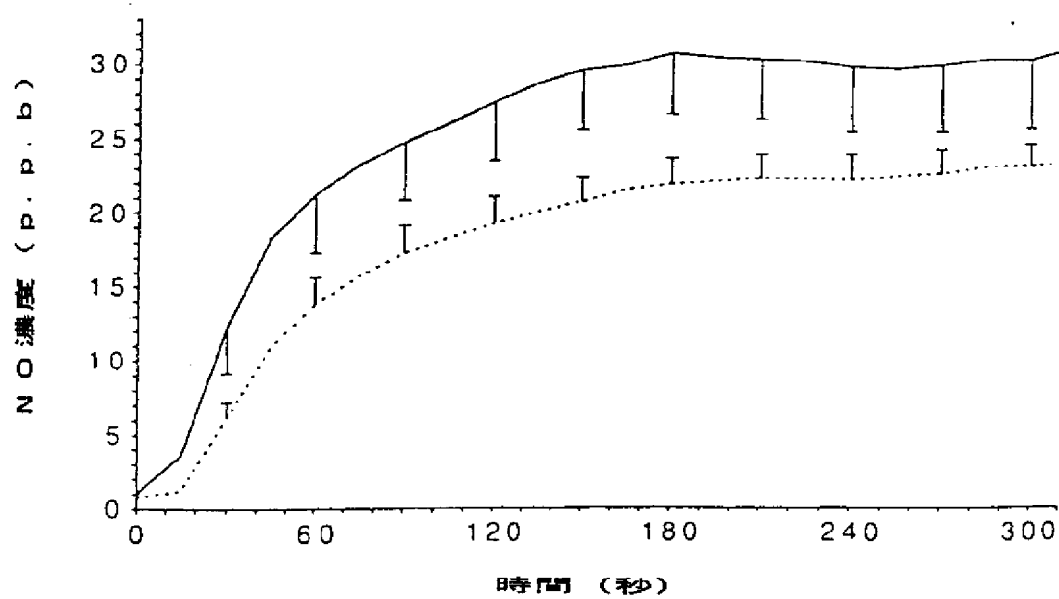


Fig. 3b



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE 94/00659

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
|---|---|---|
| IPC : G01N 33/00, G01N 33/497 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) | | |
| IPC : G01N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| SE,DK,FI,NO classes as above | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) | | |
| MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, WPI, CLAIMS | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Volume 181, No 2, December 1991, L.E. Gustafsson et al, "Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans" page 852 - page 857 -- | 1-11 |
| X | THE FASEB JOURNAL, Volume 7, February 1993, Stephen Archer, "Measurement of nitric oxide in biological models" page 349 - page 360 -- | 1-11 |
| X | WO, A1, 9305709 (GUSTAFSSON, LARS, ERIK), 1 April 1993 (01.04.93) -- | 1-11 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 25 October 1994 | | 31 -10- 1994 |
| Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86 | | Authorized officer Jonny Brun Telephone No. +46 8 782 25 00 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 94/00659

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | SE, A, 9103243 (LARS ERIK GUSTAFSSON), 4 May 1993 (04.05.93) ----- | 1-11 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

01/10/94

International application No.
PCT/SE 94/00659

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO-A1- 305709 | 01/04/93 | NONE | |
| SE-A- 9103243 | 04/05/93 | NONE | |

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), AU, CA, JP, US

(72)発明者 ワイツベリ, エドワード
スウェーデン国エス-115 50ストックホルム、スタレングスリンゲン36番

(72)発明者 ルンドベリ, ヤーン
スウェーデン国エス-182 64ユースホルム、ヘルゲベーゲン10番

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. **** shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

1. Exactly a nose and/or a mouth of an individual who means (i) mask wear A wrap face mask (1), (ii) an inflow unit for inhalation of air (2), and (iii) -- an outflow unit for expiration (3), and (iv) -- an un--rebreathing valve (5) which inhalation of air and expiration pass respectively through it, and (v) -- measuring unit [for NO (4) connected with this outflow unit (3)];

A system for measuring NO in expiration which becomes more.

2. System according to claim 1 by which inflow unit for inhalation of air (2) consists of tube (6a, 6b) which has opening to atmosphere air (9), and this tube is equipped with filter (8) for removal of NO which exists in atmosphere air (9).

3. System according to claim 1 which consists of tube connected with pressurized container in which inflow unit for inhalation of air (2) contains respiratory air (7) containing NO of level which is preferred and is not significant.

4. System according to claim 3 by which elastic vessel (11) was connected with tube (6a, 6b) between pressurized container (7) and un--rebreathing valve (5).

5. An outflow unit (3) is a measuring unit (4) in a part of expiration (sample air style).

The system according to claim 3 or 4 which has a tube for expiration (14a, 14b, 14c) which consists of a T-connection (15) for changing with **.

6. System given in claim 3 that whose it is applied so that contamination according [the system concerned] to atmosphere air in sample air style (15) may be avoided it is less than degree of average respiratory rate of flow of individual meant (minute capacity) - 5 any 1 paragraphs.

7. A filter (16) for desiccation of (i) expiration, a filter (17) for removal of CO₂ of (ii) expiration Naka, and (iii) particle filter (18);

a tube [in / a filter (16, 17, 18) that air to which at least one filter ** chosen makes a detector a target passes one filter for this few **** first is formed, and / an outflow unit (3)] (14a) -- or (14c)

A system given in claim 3 which is boiled and connected or is united with a measuring unit (4) - 6 any 1 paragraphs.

8. An outflow valve (12) for preventing (i) flow meter (10), formation of a pressure in a tube (6a, 6b) for (ii) (a) inhalation of air, and a break through of air to an outflow unit (3) which passes an un--rebreathing valve (5) from (b) inflow unit (2);

A system given in claim 3 which has an instrument of at least 1 ** chosen - 7 any 1 paragraphs.

9. How to diagnose an inflammatory disease in a respiratory tract adopting an unusual level which measured in expiration a level of NO by which it was generated on a (i) internal cause target, and was found out as for (ii) as an index of an inflammatory disease

in a respiratory tract, or its danger in mammalian.

10. A method according to claim 9 of adopting a level which measured a level of NO by taking orally or pernasal expiration, and went up as compared with a normal group as an index of an inflammatory disease in a respiratory tract, for example, asthma, and rhinitis.

11. A method according to claim 9 of adopting a level which measured a level of NO in pernasal expiration and fell as compared with a normal group as an index of acute inflammation in an upper respiratory tract.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

Refer to the name of a diagnosing method technical field invention of the disease relevant to the system and unusual NO level which are used for measurement of NO level in expiration. By the mammalian in which this invention included Homo sapiens, the level of nitric oxide (NO) in the expiration of mammalian (Homo sapiens was included) shows a certain kind of disease (illness) also including a risk of gaining it. The useful thing is shown by diagnosis of the inflammatory disease of the respiratory tract like sinopulmonary infection [in / at least / in this idea / allergic asthma and rhinitis, and Homo sapiens], and cards GENERU syndrome today. In particular, the infection in a lower respiratory tract can be diagnosed.

It has been shown that NO production in the Homo sapiens respiratory tract with a normal measurement principle used is restricted to an upper respiratory tract, especially nasal sinuses. It is also shown that NO is produced with the stomach.

A respiratory tract means the introductory respiratory tract from a nostril to the bronchiole of a breather, and are membrane tissue and nasal-sinuses ****.

Some approaches against the biological role of nitric oxide (NO) have been made over the number ten years of here [background]. It is shown that the composition of NO in which a catalyst is carried out by special NO synthase using L-arginine as a substrate takes place by the type of many cells today (Nathan C., FASEB J.6 (1992), 3051-64). this NO synthase -- two main class: -- it exists by some isotypes which can be divided into a compositional and inductive thing. Compositional isotype to endothelial cells (Moncada D.et al. and Pharmacol.Rev.43 (1991) 109-42), For example, it has been indicated that it is in a subsympathy vasodilator (Kummer W.et al., Neuroreport 3(1992)653-55).

Inductive isotype After activation, a macrophage, neutrophil leucocyte, endothelial cells, A vascular smooth muscle (Moncada S.et al. and Pharmacol.Rev.43 (1991) 109-42) and the epithelial cells in an asthmatic's respiratory tract (Springall et al., Am.Rev.Resp.Dis.147 (1993))

It is found out by A515. In some [increase / in the final product nitrite salt in plasma and urine, and a nitrate], production of NO could be used, but the former was difficult for measuring directly by in vivo (Archer S. and FASEB J.7(1992)349-360).

.However, in the expiration of a laboratory animal and Homo sapiens, it can find out on a PIPIIBII (p. p.b.) level these days (Gustafsson L.E.et al.,

Biochem.Biophys.Res.Commun, 181 (1992) 852-7). Gustafsson and others contacted the chemicals luminescence detector to expiration, or when NO aerated expiration in the solution by which a trap is carried out chemically, he measured NO level. It seems that the experiment by Homo sapiens was inhaled through the nose, and it was carried out in

one person's individual who does expiration through a mouth. When inhalation of air passes along a nose, when NO moves to it can explain comparatively high NO level which Gustafsson and others got as compared with this invention persons' thing. In a next announcement, Persson M.G. and Gustafsson L.E. were measured by the expiration of the rabbit, and what ethanol intake will reduce formation of NO for is reported (Eur.J.Pharmacol.224 (1992) 99-100). It is shown that Gustafsson L.E. itself can check a lung function using measured NO level in expiration (WO-A-9305709 and SE-91032433). The result of Gustafsson L.E. seems to be the nearest advanced technology. Between the years of a period of priority, The fall of the level in increase and the smoker of NO level in an asthmatic's expiration is released (Lancet Alving Ket al. and Eur.Resp.J.6(October, 1993)1368-70;Hamid Q.etal.). 342 (December, 1993) 1510-13;Karithonov S.A.et al., Lancet343 (January, 1994) 133-35; and Persson M.G, et al., Lancet 343 (January, 1994) 146-7.

The 1st main purpose of purpose this invention of an invention is to provide use of the discovery before saying that the nitric oxide (NO) produced autogenously can detect by expiration.

The 2nd purpose is to provide the system by which it was improved for measurement of NO level in expiration.

The 3rd purpose is improved about the disease (sick) relevant to the unusual NO level in expiration, and there is in providing the diagnosing method which can be depended for and trusted. In the priority date, this invention persons had the result that the illness to take notice of related to the infection in the inflammation disease in a respiratory tract (a risk of the symptoms being shown also includes inflammation), for example, allergic asthma, rhinitis, especially a lower respiratory tract. It has recognized that the level with NO near the zero in the air which nasal sinuses are the origin and was breathed out from the nose to which this invention persons originate in a nose is a valuable index of cards GENERU syndrome, and are probably ** and the disease nature which increased about progress of sinusitis between the years of a period of priority. Back flow air, this invention persons, contained NO of a high level (formed with the stomach), and it was shown that the unusual NO level in back flow air is connected with a stomach obstacle. For example, inhibition of stomach HCl production, or as a result of a fall, NO level can fall and this invention persons can monitor processing with the drug which checks secretion of gastric acid in this way using NO level in back flow air. The increase of NO level in expiration (preferably oral expiration) can serve as an index of a stomach esophagus (unusual break through of the contents of the stomach including NO from the stomach). It seems that the method of this invention also has prognosis value.

The explanatory views 1a and 1b of a drawing show a useful sampling and measurement system to measuring NO in pernasal expiration and /oral expiration. In drawing 1 a, this system uses the pressurization source for breathing the air which does not contain NO substantially, and the source of this is the air of atmosphere in drawing 1 b. The function to correspond in a drawing is expressed by the same number.

Drawing 2 shows the level of NO (p. p.b.) detected by the chemicals luminescence art in the expiration of the contrast test subject for the first 5 minutes of oral breathing (dotted line), pernasal breathing (solid line), or pernasal aeration (dashed line) by an air current. An arrow closes a mouth and shows the period which held its breath. Data expresses as average value**SEM.

Drawing 3 a and 3b show the level (p. p.b.) with which NO in the contrast (dotted line) for the first 5 minutes of oral breathing (drawing 3 a) and pernasal breathing (drawing 3 b) and an asthmatic's (solid line) expiration was detected. ***** SEM shows data. It compares with contrast and is **P<0.01 and ***P<0.001 (Mann-Whitney U-assay).

The system of this invention for measuring NO in the system expiration for measuring the invention NO is shown in drawing 1, and consists of the face mask (2) which covers a patient's mouth and/or nose, the inflow unit for inhalation of air (2), an outflow unit for expiration (3), and a NO measuring unit (4). This inflow and an outflow unit can be made to connect mutually via the un--rebreathing valve (5) preferably located in this face mask. It is a "face mask" so that it may be shown.

The becoming word consists of the mouthpiece or nosepiece which can breathe through it.

A mouthpiece is preferably used combining a nasal clip. The usual face mask and an un--rebreathing valve can be used. A transparent mask is advantageous when the face mask to be used covers the both sides of a mouth and a nose.

There are the two main substitutes in an inflow unit (2). The 1st substitute (drawing 1 a) consists of a tube (6a, 6b) which connects this mask (1) with the pressurization source (7) of the respiratory air containing NO (for example, less than 1p.p.b.) of less than the level found out with the air by which expiration was carried out preferably normally. The 2nd substitute (drawing 1 b) consists of a tube (6a, 6b) which connects this mask (1) with the atmosphere air (9) through the filter (8) for removing NO preferably.

In order for the air from a pressurization source (7) to balance and to support this mask (1) by smooth supply, The elastic air container (11) which flowed out with at least one flow meter (10), and was connected with the valve (12) must be connected with the tube (6a, 6b) between a mask (1) and an application-of-pressure air supply (7) in the order which goes downstream. This flow meter (10) is used in order to make consumption of a test test subject's air suit and to adjust airstream. An airstream appearance valve (12), for example, the Werner (Berner) valve, is used in order to avoid that a pressure is formed into this elastic vessel (11), but it is expanded suitably between breathing of this elastic vessel (11). Airstream appearance valve (12)

It should set up open ** and air with the low pressure which it does not let pass on an un--rebreathing valve (5). Preferably, this elastic vessel (11) has common inflow/tap hole connected with the tube via T-connection (13).

T-connection (15) from which the discharge system for expiration (3) divides a tube (14a, 14b, 14c) and an outflow style into two lines (14b, 14c)

It becomes more. The line (14c) of 1 leads a part of expiration to a measuring unit (4).

Other lines (14b) manage superfluous air, and draw it to atmosphere air (9). A shown flow to a measuring unit can be set by a different method. It has Bildt (built) in the flow regulator for controlling almost all flow by which available NO detector passes along this detector commercially. In other substitutes, although it is important to secure that outflow tubes (14a, 14b, 14c) supply an expiration style to a measuring unit (detector), it can have one or more valves for adjusting a partial flow which goes to a measuring unit (4).

Superfluous air can be led to atmosphere air via the tube (14b) of suitable length, and the back run and contamination from air of atmosphere can be avoided. for example, more than 5% in which a part of expiration style which faces to a measuring unit is smaller than the degree of average respiratory rate of flow in order to secure that the

contamination from atmosphere air does not invade into a measuring unit (detector) of the degrees of average respiratory rate of flow -- it should consider as less than 50% preferably. It goes to a measuring unit (shown in 4 and drawing 1 b), or one or more filters (16, 17, 18) for removal of the substance which exists in the expiration which may interfere in measurement of NO may be among the method tubes of outside (14a, 14c) united with the measuring unit (shown in 4 and drawing 1 a). Refer to postscript.

A measuring unit is made with what consists of one which gives the sensitivity (1p.p.b. and more than it) with which it should be [for measuring NO in the air] satisfied of methods. The art of accepting to usual is based on chemicals luminescence, and is a luminous reaction. : $\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2(\text{or } \text{NO}_2^*) + \text{O}_2$ is used. About 20% of NO_2 formed is obtained by an excitation state (NO_2^*). Luminescence occurs between the transition to NO_2 from NO_2^* (chemicals luminescence), and this is proportional to NO concentration. O_3 is supplied superfluously. Fontijn et al. and Anal.Chem.42 (1970) 575 -79 reference. The signal from a luminous reaction (from NO_2^* to NO_2) can be reduced with water and the substance like carbon dioxide. This means that it must remove from a sample before measuring these substances, in order to obtain an absolute value. This can be attained by letting a sample pass in a filter, in order to remove the substance which interferes in measurement operation (17 which is a filter for 16 and CO_2 which is a filter for water). The interfering substances of the 2nd type are particles removable with a filter (18 which is a particle filter). Since the content of carbon dioxide and water is quite constant in expiration, abbreviation ***** can do the filter which leaves the most important particle filter (18) and corresponds by the system of this invention. The detector/instrument (19) for which it is suitable in order to measure NO can be obtained in a commercial scene. Said reference.

The system concerned can be used by the continuous measurement (mixture air of some times breathing) covering a long time, or measurement (single respiratory analysis) of NO in the expiration of each breathing. The system concerned enables measurement of the peak NO level after returning air from the stomach. Use of the system of this invention is indicated in an experiment part. Refer to postscript.

The system used with the experiment part was considered to be the most desirable thing as of the priority date. Between the years of a period of priority, when oral expiration is sampled, it has been recognized that a mouth mask (mouthpiece) is convenient by a patient.

Diagnosing method The methods of this invention are mammalian which worries about an inflammation disease (therefore, danger is also included) in a respiratory tract, and a diagnosing method which discovers the Homo sapiens individual preferably. This method measures NO autogenously generated in the expiration from mammalian, and the found-out abnormal level has the feature in the point used as the index of the inflammation disease in the respiratory tract of mammalian.

About the air breathed out from the nose, relating to the acute inflammatory reaction which lowered NO level causes the severe rhinodema and secretion was found out, and, on the other hand, it was found out that NO level which went up relates to low exposure of the inflammation drugs of atmosphere and/or the danger of nose inflammation. In this way, the level with which NO between pernasal breathing went up can be related to the latency and clinical both the inflammation disease in the tunica mucosa nasi. About oral expiration, NO level with which the low range went up serves as an index of the latency

disease in a lower respiratory tract, in this way, it becomes the prognostic about generating of a clinical inflammation disease, and, on the other hand, the high range serves as an index of both the acuteness in a lower respiratory tract, and a chronic-inflammation nature disease. NO level in pernasal expiration and oral expiration is compared, and the relative contribution from a lower respiratory tract and an upper respiratory tract should be determined respectively.

A "lower respiratory tract" and "upper respiratory tract" The becoming word means a glottal lower part and the upper part respectively.

As for a patient, when measuring NO in oral expiration, it is preferred to carry out expiration through a mouth.

As for a patient, about pernasal expiration, inhaling through a nose is preferred similarly.

Material and the theme of a method experiment: NO level was measured by the Homo sapiens test subject's expiration. The contrast test subject was a nonsmoker and was a healthy individual (27-52 years old), and the asthmatic was a nonsmoker by whom the allergy to rat allergen, light asthma, and a chief condition of rhinitis were checked at least, and was an individual (33-45 years old) of atopy. The asthmatic tested during the non-condition except for two cases (refer to postscript). Made two of asthmatics inhale glucocorticoid (BUDESONIDE (budesonide)) regularly, when two persons had signs, beta2-agonist or clo MOGURIKETO (cromoglycate) was made to inhale, and four persons were not made to take in any drugs. The group (n= 9) of the test subject who does not have asthma although it has allergic rhinitis to **** pollen removed the season of pollen, and tested it between pernasal breathing before and behind ***** in allergen. Although it had allergic rhinitis (*****), in other two test subjects without asthma, the season of pollen was removed and oral breathing was considered as the test. Although it had allergic rhinitis (*****), in one more test subject without asthma, taking orally and pernasal breathing were tested immediately after the **** pollen season. Except for three cases of the lower respiratory tract virus infection in a contrast test subject, all the test subjects tested, when there was no consciousness of respiratory infection. In the patient without asthma who intubated and who aerates mechanically, the expiration NO was measured at the intensive nursing room. The experiment was approved by the district Ethics Committee.

The method system was constituted as shown in drawing 1, it inhaled NO free (<1p.p.b.) air from a gas tube, and measured NO in expiration that it is simultaneous and continuously. Since it was considered that the water in expiration and the content of carbon dioxide were constant, the filter of water and carbon dioxide was not included. The burner valve was used as an airstream appearance valve (12).

When using it, the system was rinsed with NO-free air (preferably <1p.p.b.NO) closing a face mask tap hole and the tap hole in a burner valve, and by setting a flow of air as a part for 2-1/. When chemicals luminescence NO reading descended to 1p.p.b., the plug of the tap hole in a face mask was removed, and the test's nose and message of the test subject were quickly equipped with the face mask. Subsequently, the tap hole of the burner valve was set as 2cmH₂O, airstream was adjusted, and the elastic vessel was expanded to about 3/4 of maximum capacity (a part for 6-8-l./per adult). The mouth was closed for the individual who tests, and it let the nose pass, or let the mouth pass using the nasal clip, and was made to breathe freely in a face mask. Breathing was made to continue until the plateau level of NO in expiration was accepted (this system <= 5 minutes).

In order to evaluate the contribution from a nose respiratory tract, it was made to breathe through a mouth, or its breath was held, the NO-free air current (a part for 2-5-l.) was introduced through a contrast individual's nostril of 1, and outflow air was sampled from the opposite side. Same measurement was performed in the mouth, having put input and a tap hole into the corner where mouths differ, and holding its breath. Via a Teflon tube. By sampling continuously by a part for 0.7-l./to a NO/NO_x chemicals luminescence analysis machine (Eco Physics., Basel, and Switzerland;Fontijn et al., Anal., and Chem.42 (1970) 575 -79 reference), NO by the side of an outflow and the level of nitrogen dioxide (NO₂) were measured. measuring NO_x using a molybdenum thermal converter (Eco Physics), after changing into NO from NO₂ -- formula:[NO₂] = [NO_x] - [NO]

NO₂ concentration was calculated as be alike.

a result -- a healthy contrast test subject -- a mouth and a nose -- leading -- breathing -- making -- if -- oral breathing (9**1p.p.b.) -- comparing -- NO level quite (23**2p.p.b.) high between nasal breathing -- accepting -- having had (drawing 2). In this system, the plateau level of NO was reached within 4 minutes, and the further change was not accepted within a total of 10 minutes. The level of NO became very high by the tap hole side as a result of ventilation of the nose respiratory tract for 2 l. of airstream/(drawing 2). Supposing the test subject closed the mouth, held his breath and sent all the air from the nasal cavity of 1 to other nasal cavities via nasopharynx in this way, these levels went up further.

By contrast, it was set to the low plateau level of NO as a result of the same experiment in the mouth (<=4p.p.b., n= 5). It accepted by the tap hole side of the patient whom the very low plateau level of NO intubated and aerated mechanically (n= 5). When these are taken into consideration, this shows that NO in the expiration in a normal test subject is generated mainly by the tunica mucosa nasi. In the individual of those who go, NO₂ (<=5p.p.b.) of the low was observed by expiration by the beginning in a measurement period. However, between breathing of NO₂-free air, expiration NO₂ concentration fell and reached within 5 minutes at the basal level (<=2p.p.b.).

In the group of a non-condition atopy test subject with light asthma and rhinitis, the level of NO in the expiration during oral breathing was 2 to 3 times more expensive as compared with the contrast test subject (drawing 3 a). When the plateau level was compared, there was no duplication between contrast (range 5-16p.p.b., n= 12) and an asthmatic (range 21-31p.p.b., n= 8). After being exposed [chief] to the allergen which causes the condition of bronchial obstruction, in the expiration NO (6-8p.p.b.), the further rise was accepted by two asthmatics who are not taking in glucocorticoid periodically. Between the episode of the lower sinopulmonary infection in the contrast test subject who causes the pain of a cough and a trachea bronchial tube, The rise of NO level in the expiration between oral breathing was accepted (before [a condition period] 11**2p.p.b., and 32in condition period**4p.p.b., and after [a condition period] 16**1p.p.b., n= 3). On the other hand, during pernasal breathing, in spite of having accepted the upward tendency, the significant rise of NO level in expiration was not accepted between lower sinopulmonary infection in (drawing 3 b) the asthmatic (not shown). In the patient with allergic rhinitis (n= 9), the basic plateau level of NO in the expiration between pernasal breathing was close to the level in a contrast test subject, when it tested to out of season (21**2p.p.b.). However, 2 minutes after stimulating a nose

with allergen, the plateau level of NO fell slightly and became 17**2p.p.b. Although this fall was maintained for 15 minutes, NO level in the expiration between pernasal breathing in these test subjects returned to the baseline 24 hours afterward. Oral breathing was tested in other two test subjects with allergic rhinitis (*****). The plateau level (reaching 21 respectively 23p.p.b.) in which NO in comparison with nonallergic contrast went up was accepted by these test subjects. In one more test subject with allergic rhinitis (*****), taking orally and pernasal breathing were tested immediately after the season of **** pollen. In this test subject, the plateau level in which NO between pernasal breathing (40p.p.b.) in comparison with contrast (range 16-29p.p.b.) went up was accepted. However, this test subject had a low plateau level (11p.p.b.) during oral breathing.

It seems that basic production of NO in the Homo sapiens respiratory tract is limited to the tunica mucosa nasi as detected in consideration expiration. Although the exact source of NO is not clear, Probably, they are endothelial cells (Moncada S. et al. and Pharmacol. Rev. 43 (1991) 109-142) or the parasympathetic nerve (Kummer W. et al., Neuroreport 3(1992)635-655). This suits the seemingly quite low basal level of NO produced by a lower respiratory tract. It is because the vascularization and parasympathetic innervation are [both / tunica mucosa nasi] low in the trachea tunica muscosa bronchiorum (the volume Lundberg J.M. et al. and on In Bjorklund et al.) Handbook of Chemical Neuroanatomy, vol 6: The peripheral Nnervoussystem. Amsterdam, Elsevier, and 1988 391-444. Probably, as compared with what was detected by the intubation test subject, the high level of NO accepted between oral breathing expresses NO originating in nasopharyngeal mucosa. The transient existence of NO₂ in expiration is interpreted before the respiratory start of NO₂-free air as clearance of NO₂ absorbed from atmosphere air (NO₂ concentration between 5 - 20p.p.b.). Discovery that the expiration NO level between pernasal breathing in the test subject who has both allergic asthma and rhinitis did not increase intentionally will reflect the low of NO synthase in the lumen structure of a nose respiratory tract which can be derived. Movement of NO from ***** like endothelial cells and the parasympathetic nerve to a lumen falls by secretion, an edema, and/or congestion, and, as a result, the perviousness about NO in the tunica mucosa nasi which carried out inflammation of another explanation decreases. Probably, this will carry out the mask of the increase in NO production in the lumen structure of the tunica mucosa nasi, when it measures by ** and expiration. As a result of acute exposure to the tunica mucosa nasi of allergen, the level of the expiration NO during pernasal breathing falls, and, on the other hand, this idea is supported by the fact that NO level between oral breathing goes up, as a result of acute exposure of the tunica muscosa bronchiorum. However, the knowledge that NO level in the expiration between pernasal breathing increased after the season of pollen shows that NO synthase is derived in lumen structure after long-term low-dose exposure of allergen. Although it had allergic rhinitis, in two of three test subjects, NO level went up as a result of oral breathing in a test subject without asthma. The test subject in whom two test subjects in whom the level went up fell ill in pharynx condition between exposure of allergen, and a level did not go up on the other hand was not so. This shows what the rise of the level of NO in the expiration between oral breathing could predict generating of the asthmatic future for.

The experiment of the 1st series of an addition of the experiment part between priority years was conducted in order that the nitric oxide (NO) produced with the stomach might confirm whether contribute to the level found out by expiration.

Material and method test subject: The test subject who experimented Four healthy nonsmokers' individual (29-40 years old), And it was four nonsmokers' atopy individual (30-40 years old), and they were those by whom the allergy turned to rat allergen, quiet asthma, and a chief condition of rhinitis at least is checked. In having condition, one of asthmatics is inhaling glucocorticoid (budesonide) periodically.

Other three persons were inhaling beta 2 agonist or sodium clo MOGURIKETO.

All the test subjects tested, when there was no consciousness of sinopulmonary infection. NO level in the air returned from the stomach: The arbitrary back runs of air were performed 30-cl aerated water and 3 to 5 minutes after ingestion of pH 5.5 (RamloesaR, Pripps AB, Sweden). Back flow air was led to the Teflon tube system, from there, sampled air continuously to NO chemicals luminescence analyzer (CLD700;Eco Physics, Switzerland), and registered the peak level of NO between eupnea. Pretreatment of the following [measurement / of NO in the air which flowed backwards from the stomach]:

1.NO pretreatment (contrast)

2. Ingestion of iceberg lettuce 50g (nitrate load)

3. Ingestion of lettuce 50g after oral pretreatment by total (Astra-Hassle AB, Gothenburg, Sweden) of 240 mg of protonpump inhibitor omeprazole distributed over 24 hours in advance of experiment and 4. omeprazole pretreatment;

** -- it carried out 10 hours after the fast combining one.

NO level of expiration: The test subject made it equip with a nasal clip, and made NO free air ($\text{NO} < 2 \text{ p.p.b.}$) breathe with the usual 1-time respiratory capacity via the mouthpiece connected with the un--rebreathing valve. Expiration was led to the Teflon tube system, air was continuously sampled from there (a part for 0.8-1.), and the stationary state level of NO was recorded. 10 hours after the fast, measurement was not performed regardless of the existence of omeprazole pretreatment. Making the patient who stopped medicine administration with a healthy test subject and publicly known stomach esophagus reflection carry a nasal clip, you made it breathe in a face mask, and both made it sit on erection, and it was considered as the turning-up position. The deglutition was recorded.

Result: The contrast NO level 10 hours after the fast in back flow air is $602 \pm 102 \text{ p.p.}$, and these levels went up 4 times after ingestion of lettuce. In the both sides in the case of being nothing, pretreatment by omeprazole reduced NO level in back flow air, when there was ingestion of lettuce (reaching 95% respectively 75%). In a healthy test subject and asthmatic, the regular levels of NO in the expiration between breathing with normal displacement were $4 \pm 1 \text{ p.p.b.}$ ($n = 4$) and $14 \pm 1 \text{ p.p.b.}$ ($n = 4$) respectively 10 hours after the fast ($P < 0.05$). Omeprazole pretreatment did not change these levels in which group intentionally, either. When increasing an invitro experiment by pH within the limits of 0.9 thru/or 2.5 in the lettuce and the saliva independent which digested acidity, it was shown that formation of NO increased.

In both the healthy test subject with stomach esophagus reflection, and the patient, the peak (it increases three to 4 times as compared with a basal level) accidental [NO level] and quick was accepted between oral breathing by the supine position. NO peak was

always related to the deglutition in a contrast test subject, and, on the other hand, some NO peaks unrelated to a deglutition were accepted by the reflective patient.

Examination: In this experiment, this invention persons traced the stomach as a source of main of NO.

It seems that the inside NO of the stomach is mainly formed nonenzymatic, and needs acidic environment. It is because inhibition of secretion of the gastric acid by omeprazole lost most NO(s) in back flow air. This shows that the level of NO in back flow air reflects the pH of gastric juice. The level of NO in back flow air was about 100 times more expensive among fast conditions compared with the level in the expiration between breathing of the normal displacement which leads a mouth, and the 400 times higher thing became clear after nitrate ingestion. It seems that however, the high NO level in the stomach is not continuously contributed to NO level in expiration between normal breathing in a healthy test subject or asthmatic. It is because NO level in oral expiration was not influenced by omeprazole pretreatment. These knowledge shows a possibility that it can be used by diagnosis of stomach esophagus reflection in a patient, a deglutition unrelated NO peak serves as an index of stomach esophagus reflection, and measurement is preferably performed about oral expiration by the patient of a horizontal position. It can be used for NO level in back flow air monitoring the therapy in the drug which checks gastric-acid secretion.

The experiment of the 2nd series of nose origin NO was conducted in order to judge the exact origin and significance of NO of nose origin.

Material and method: In three healthy volunteers, air was directly sampled from the maxillary sinus of 1 to the syringe via the penetration (automatic hypodermic needle) which passes along a nasal cavity to a nose wall. The sample of air was directly poured into NO analyzer, and registered the peak level. The nasal cavity and the membrane biopsy from a maxillary sinus were taken by the patient who has undergone the operation, and existence of different NO synthase was investigated by the immunohistochemical art using a specific monoclonal antibody. The expiration NO level was measured by the patient with cards GENERU syndrome (n= 4).

Result: Compared with the air (200-300p.p.b.) from a nasal cavity, quite high NO level was observed with the air (3000-4000p.p.b.) collected from the maxillary sinus.

Although it agreed in it and the high manifestation of the gestalt of NO synthase which can be derived was detected by the immunohistochemistry in the epithelial cells from a maxillary sinus, it was not detected in the thing from a nasal cavity. In the patient with cards GENERU syndrome, the expiration NO level near zero was found out between both taking orally and pernasal breathing.

Examination: When it is compositionally revealed and NO synthase which can be derived is seen by the epithelial cells of the Homo sapiens nasal sinuses, it very seems to be activity. The high lumen concentration of NO in nasal sinuses is an important ingredient of defense of a primary and nonspecific host. It is because it is shown that high-concentration NO has bacteriostatic action (Moncada S.et al. and Pharmacol.Rev.43 (1991) 109-42) and nasal sinuses are usually sterilized in contrast with the nasal cavity. In this way, the low nose concentration of NO can serve as the index of disease nature that the respiratory-epithelium disease like cards GENERU syndrome and sinusitis increased.
